

高盐摄入对小鼠肠道 GLP-1 表达的影响

段碧晗 高 凌

摘 要 目的 探讨高盐饮食对小鼠血糖、血压、血脂以及肠道胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 的影响。**方法** 实验于 2020 年 8~11 月在武汉大学人民医院动物实验中心和中心实验室进行。8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 20 只, 依照数字表法随机分为对照组和高盐组, 每组各 10 只。高盐组予含 8% 的 NaCl 高盐特制饲料喂养, 对照组予普通饲料喂养, 实验时间 8 周。在实验末测量小鼠尾动脉血压, 实验结束后测定空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血脂水平, 免疫组化检测小鼠小肠 GLP-1 的表达。**结果** 与对照组比较, 高盐饮食喂养 8 周后, 高盐组空腹血糖显著升高 ($P < 0.05$)。高盐组小鼠血清血脂水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。高盐组收缩压、舒张压水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高盐组小肠 GLP-1 表达降低。**结论** 高盐饮食可以影响小鼠糖脂代谢、血压, 其原因可能与肠道 GLP-1 水平有关。

关键词 高盐饮食 糖脂代谢 血压 胰高血糖素样肽 1

中图分类号 R589.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.07.027

Effect of High-salt Intake on GLP-1 Expression of the Intestine. Duan Bihan, Gao Ling. Department of Endocrinology & Metabolism, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To compare the expression of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in the small intestine between high-salt intake and control mice. **Methods** The experiment was conducted in the Central Laboratory of People's Hospital of Wuhan University from August 2020 to November 2020. Eight-week-old male C57BL/6 mice with SPF grades were fed a standard or high-salt diet for 8 weeks (10 in each group). Blood pressure (BP) was measured on the seventh week. Blood was sampled for fasting blood glucose (FBG), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-ch) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-ch) assays. Small intestinal tissue were analyzed for GLP-1 expression by immunohistochemistry. **Results** The systolic and diastolic BP were higher in high-salt diet than standard diet ($P < 0.05$) with significant difference. Plasma glucose, TC, TG level were lower in high-salt diet than control mice ($P < 0.05$). Compared to the control group, the expression of GLP-1 in the small intestine were lower. **Conclusion** Changes in glucose, lipid and blood pressure after a high-salt diet appear related to the changes in the expression of GLP-1 in the small intestine.

Key words High-salt intake; Glycolipid metabolism; Blood pressure; GLP-1

随着 2 型糖尿病和高血压发生率的明显增加, 伴有高血压的糖尿病患者罹患心血管疾病的风险增加了 1 倍^[1]。而高盐摄入被认为是与生活方式有关的高血压和心血管疾病的重要危险因素^[2]。在人群中减少盐的摄入被认为是预防糖尿病等非传染性疾病 (non-communicable diseases, NCDs) 的前 5 项干预措施之一^[3]。为了减少 NCDs, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 计划将盐摄入量减少 30%, 并将此计划作为九个全球目标之一^[4]。目前高血压和糖尿病的发生率逐年上升, 两种疾病都会导致严重的并发症, 例如心血管疾病和慢性肾脏疾病

等^[5]。这会在很长一段时间内增加死亡风险, 因此预防和延缓高血压、糖尿病的发生是医学面临的巨大挑战。

盐作为一种无热量的必需微量元素, 最近发现它与糖尿病的发展有关。在一项纵向研究中发现, 高盐摄入量可以独立预测糖尿病的发生^[6]。胃肠道营养素触发的信号, 如胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 在调节能量摄入中起重要作用。GLP-1 主要是由肠道的 L 细胞中产生的肠源激素, 通过增加胰岛素和抑制胰高血糖素分泌来控制膳食相关的血糖波动, 同时还能抑制胃排空和食物摄入^[7]。同时过量的盐摄入与心血管疾病相关, 并认为是高血压发病的病因之一^[8]。高盐饮食可通过不同途径促进高血压的发展^[9, 10]。有趣的是, GLP-1 也为心血管系统带来了好处。例如抑制高血压的发

作者单位: 430060 武汉大学人民医院内分泌科

通讯作者: 高凌, 电子信箱: ling.gao@whu.edu.cn

展,减少心脏纤维化和肥大^[11]。有报道称,GLP-1 可通过利尿和利钠作用降低血压,GLP-1 受体的活化通过促进心钠素的分泌而降低血压^[11]。而高盐饮食衰减 GLP-1 对血压的保护作用^[12, 13]。目前关于肠道 GLP-1 表达水平与小鼠饮食盐摄入量之间关系的研究较少。本研究旨在观察高盐饮食后,小鼠糖脂代谢、血压及肠道 GLP-1 表达的变化。

材料与方 法

1. 实验动物与分组:20 只 8 周大的 C57BL/6 雄性小鼠,SPF(specific pathogen free)级,由武汉大学人民医院动物实验中心提供。实验动物饲养在 SPF 级屏障环境中,适应性喂养 1 周后开始实验。称量实验动物体质量,依照数字表法随机分为两组,正常对照组:整个实验过程中用普通饲料喂养小鼠($n=10$);高盐组:小鼠接受特制高盐饲料($n=10$),每组小鼠均自由进食、饮水,接受同等的光照时长,实验持续时间为 8 周。

2. 试剂与仪器:特制 8% 高盐饲料,高盐饲料为在普通饲料基础上每 100g 普通饲料添加 8g NaCl 的 8% 高盐特制饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司),血糖仪与配套的血糖试纸(日本泰尔茂公司),无创血压系统(CODA,美国 Kent Scientific 公司),称量器(MP2001,上海舜宇恒平科学仪器公司),分析天平(CPI24S,德国赛多利斯公司),正置显微镜(BX51,日本奥林巴斯公司),生化自动分析仪(ADVIA2400,德国西门子公司),病理切片机(RM2601,上海徠卡仪器有限公司),4% 甲醛固定液(武汉谷歌生物有限公司),GLP-1 抗体(武汉谷歌生物有限公司),戊巴比妥钠(德国 Merck 公司)。

3. 空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)测定:于实验末,将实验小鼠禁食(不禁水)14h 后,抓取并固定小鼠,将尾尖剪去约 3mm,采血约 0.05ml,按照血糖仪说明书步骤测定小鼠尾静脉快速血糖。

4. 血压测量:实验 8 周后,使用标准无创尾部血压测量系统测量小鼠尾动脉血压,保持小鼠安静状态,将袖带附在尾巴上,然后记录收缩压和舒张压,重复测量 15 次,取平均值为最终血压值。

5. 血脂检测:通过眼眶取血收集血液,离心后分

离小鼠血清并保存至-80℃直至分析。血清甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(serum total cholesterol,TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol,HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol,LDL-C)使用全自动生化分析仪测量。

6. 肠道(小肠上段)GLP-1 检测:小鼠予 1% 戊巴比妥钠麻醉(50mg/kg),眼眶取血后处死,打开腹腔及胸腔,使用 0.9% NaCl 注射液对小鼠予以心脏灌流,待肾脏由红色变为灰白色即可,分离出小肠,分别做好标记后,将标本固定于 4% 多聚甲醛中 48h,脱水后进行石蜡包埋,用于免疫组化实验。根据免疫组化实验步骤,检测小鼠肠道 GLP-1 的表达,通过正置显微镜观察切片,采集图像后分析结果。

7. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对实验结果进行处理分析,所有计量资料数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠一般情况比较:实验前,高盐组和对照组小鼠毛发光滑润泽,反应灵敏。实验 8 周时,两组外观无明显差别。于实验第 4 周末及 8 周末时称量小鼠体质量,与对照组比较,高盐组小鼠的体质量增加差异无统计学意义($P>0.05$),两组小鼠体质量情况详见表 1。

表 1 两组小鼠体质量情况($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	0 周	4 周	8 周
对照组	10	23.65 ± 0.32	27.78 ± 1.01	28.00 ± 1.33
高盐组	10	23.48 ± 1.06	28.08 ± 1.71	28.45 ± 1.67

与对照组比较, $P>0.05$

2. 小鼠血脂和 FBG 的比较:与正常对照组比较,实验末,在禁食(不禁水)状态下,8% 高盐饮食 8 周后,高盐组 FBG 水平明显高于正常对照组($P<0.05$)。高盐饮食组小鼠血清中 TC、TG 含量明显升高($P<0.05$),HDL-C 含量明显降低($P<0.05$),两组小鼠血清中 LDL-C 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 血脂与 FBG 情况($\bar{x} \pm s, mmol/L$)

组别	n	FBG	TC	TG	HDL-ch	LDL-ch
对照组	10	6.90 ± 0.83	2.18 ± 0.05	0.62 ± 0.10	1.26 ± 0.32	0.12 ± 0.03
高盐组	10	8.44 ± 1.20*	2.42 ± 0.04**	1.07 ± 0.05**	0.99 ± 0.42**	0.11 ± 0.02

与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3. 小鼠血压比较:与处理前比较,8%高盐饲料喂养8周后,高盐组收缩压、舒张压均显著增高,差异有统计学意义(表3)。

表3 小鼠实验前后血压比较(mmHg^A, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	处理前	高盐饮食8周后
对照组收缩压	103.83 ± 9.37	105.67 ± 2.73
对照组舒张压	77.50 ± 5.43	73.33 ± 8.82
高盐组收缩压	108.50 ± 7.09	129.33 ± 11.36**
高盐组舒张压	70.16 ± 6.88	89.33 ± 14.19*

与对照组比较,高盐组收缩压、舒张压均升高,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;^A1mmHg = 0.133kPa

4. 小鼠小肠上段 GLP - 1 表达的变化:GLP - 1 的免疫反应性位于肠道黏膜的卵圆形或锥体上皮细胞的细胞质中,其形态与肠道内分泌细胞一致,小鼠小肠上段组织中 GLP - 1 阳性表达为胞质内淡黄色 - 棕黄色颗粒。与对照组比较,实验8周后,小鼠小肠上段免疫组化染色结果显示,高盐组小鼠小肠上段 GLP - 1 阳性细胞数量明显少于对照组小鼠($P < 0.05$,图1)。对照组和高盐组小肠上段组织 GLP - 1 阳性表达的平均累计吸光度分别为:对照组 13.53 ± 1.66 ,高盐组 6.58 ± 2.11 ,差异有统计学意义($P = 0.011$)。

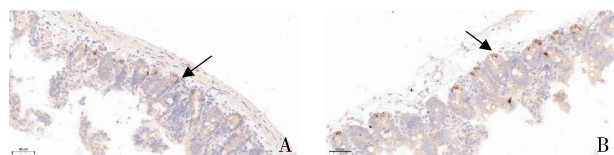


图1 小鼠小肠上段组织 GLP - 1 表达的变化
(免疫组化染色, $\times 200$)

A. 高盐组;B. 对照组;箭头指示阳性细胞

讨 论

每天适量的盐摄入对于维持细胞外液、血压、血管功能的稳态至关重要^[14]。但现在越来越多的证据表明,高盐饮食与许多疾病之间存在联系。为了研究高盐饮食对小鼠糖脂代谢、血压及肠道 GLP - 1 表达的影响,笔者分析了喂养高盐饮食8周的小鼠 FBG、血清血脂水平、血压及肠道 GLP - 1 表达情况。在这项研究中,尽管未观察到小鼠体质量的变化,但是,与对照组比较,8%高盐饲料喂养8周后,小鼠表现出空腹血糖受损、血脂异常、血压升高。另外,小鼠肠道 GLP - 1 的表达也会减少。这些变化意味着高盐摄入会影响小鼠的健康。实验结果提示高盐饮食可引起小鼠空腹血糖、血清血脂高于对照组,同时升高血压。

这可能与高盐饮食导致 GLP - 1 表达减少有关。

本研究发现,8%高盐饮食8周后,小鼠血压水平与对照组比较升高。有研究表明血清活性 GLP - 1 具有抗高血压作用。GLP - 1 受体在肾脏中表达,介导利尿和利钠作用^[15]。研究表明,GLP - 1 对肾素 - 血管紧张素醛固酮具有抑制作用^[16]。高盐饮食后,肠道 GLP - 1 表达水平降低,从而减弱 GLP - 1 对血压的保护作用。在一般人群中,空腹葡萄糖受损是一种常见的血糖异常,空腹葡萄糖受损被认为是糖尿病前期状态。在收缩压 ≥ 140 mmHg 时,空腹血糖受损会显著增加8年总病死率和心血管疾病病死率^[17]。本研究发现,与对照组比较,高盐组小鼠实验8周后,FBG 水平升高。GLP - 1 有利于降低血糖并使血糖维持在恒定水平。高盐饮食后,小鼠 FBG 升高可能与肠道 GLP - 1 表达水平降低有关。血清 TC 水平的升高被证明是冠心病的危险因素。同时,TG 水平升高与心血管事件发生率增加独立相关^[18]。本研究发现高盐饮食使得血清 TC、TG 水平明显升高,这一结果提示高盐饮食与心血管疾病密切相关。

本研究检测了小鼠小肠 GLP - 1 的表达。GLP - 1 是肠内分泌 L 细胞中产生的肠降血糖激素,并根据食物摄入而释放到血液中^[19]。此前的研究已经提出,GLP - 1 可抑制胃排空,以抑制附加的食物摄取和餐后高血糖^[20]。到目前为止,盐调节 GLP - 1 的分子机制尚不明确,可能通过以下作用机制起作用,首先,钠葡萄糖同向共转运蛋白 1(sodium glucose co - transporter 1, SGLT - 1)抑制后可增强肠促胰素 GLP - 1 分泌^[21, 22]。此外,本课题组前期研究发现,与正常饮食小鼠比较,高盐饮食后小鼠肠道 SGLT - 1 表达增加^[23]。可推断高盐干预会降低并延迟 GLP - 1 的分泌。其次有文献报道,高盐摄入(含 5% NaCl)可导致自主神经活动减弱。高盐摄入引起的自主神经活动减弱也可能导致 GLP - 1 分泌减少。ATP 敏感性钾通道(ATP - sensitive potassium channel, KATP)与葡萄糖触发的 GLP - 1 释放有关,而醋酸脱氧皮质酮盐型高血压大鼠中 KATP 功能是受损的。因此笔者推断受损的 KATP 可能导致 GLP - 1 释放减少。这些研究共同表明,高盐饮食可导致小鼠 GLP - 1 的表达、分泌和释放减少。

综上所述,本研究表明高盐饮食会降低小鼠小肠 GLP - 1 的表达,并升高小鼠的血压,影响小鼠的糖脂代谢,而小鼠的血压和糖脂代谢与 GLP - 1 密切相关。笔者希望提供有关高盐摄入对心血管疾病、糖脂

代谢影响的证据。高血压和糖尿病为慢性病的两大主要病种,在心血管疾病、糖尿病等慢性病防治中,应强调对盐摄入限制的重要性,减少钠盐的摄入,降低心血管疾病、糖尿病等疾病风险。

参考文献

- 1 Takagi Y, Kadowaki H, Kobayashi I, *et al.* Effects of high - sodium intake on systemic blood pressure and vascular responses in spontaneously diabetic WBN/Kob - Lepr rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(2): 305 - 312
- 2 Morrison AC, Ness RB. Sodium intake and cardiovascular disease [J]. *Annu Rev Public Health*, 2011, 32: 71 - 90
- 3 Beaglehole R, Bonita R, Horton R, *et al.* Priority actions for the non - communicable disease crisis [J]. *Lancet*, 2011, 377(9775): 1438 - 1447
- 4 Yokoyama Y, Nakamura TJ, Yoshimoto K, *et al.* A high - salt/high fat diet alters circadian locomotor activity and glucocorticoid synthesis in mice [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233386
- 5 Tatsumi Y, Ohkubo T. Hypertension with diabetes mellitus: significance from an epidemiological perspective for Japanese [J]. *Hypertens Res*, 2017, 40(9): 795 - 806
- 6 Lanaspas MA, Kuwabara M, Andres - Hernando A, *et al.* High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(12): 3138 - 3143
- 7 尹卫芹, 张文健, 许世清, 等. GLP - 1 类药物对糖尿病肾病肾脏保护作用的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(8): 191 - 193, 120
- 8 Ibrahim MM, Damasceno A. Hypertension in developing countries [J]. *Lancet*, 2012, 380(9841): 611 - 619
- 9 Weinberger MH. Pathogenesis of salt sensitivity of blood pressure [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2006, 8(2): 166 - 170
- 10 Stocker SD, Madden CJ, Sved AF. Excess dietary salt intake alters the excitability of central sympathetic networks [J]. *Physiol Behav*, 2010, 100(5): 519 - 524
- 11 Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, *et al.* GLP - 1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 567 - 575
- 12 Yu M, Moreno C, Hoagland KM, *et al.* Antihypertensive effect of

glucagon - like peptide 1 in Dahl salt - sensitive rats [J]. *J Hypertens*, 2003, 21(6): 1125 - 1135

- 13 Temboot P, Lee RFS, Menin L, *et al.* Biochemical and biophysical characterization of ruthenation of BRCA1 RING protein by RAPTA complexes and its E3 ubiquitin ligase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(2): 355 - 361
- 14 Panth N, Park SH, Kim HJ, *et al.* Protective effect of salicornia europaea extracts on high salt intake - induced vascular dysfunction and hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1176
- 15 von Websky K, Reichetzeder C, Hocher B. Physiology and pathophysiology of incretins in the kidney [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2014, 23(1): 54 - 60
- 16 Skov J, Dejgaard A, Frøkiær J, *et al.* Glucagon - like peptide - 1 (GLP - 1): effect on kidney hemodynamics and renin - angiotensin - aldosterone system in healthy men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(4): E664 - E671
- 17 Henry P, Thomas F, Benetos A, *et al.* Impaired fasting glucose, blood pressure and cardiovascular disease mortality [J]. *Hypertension*, 2002, 40(4): 458 - 463
- 18 Toth PP. Triglyceride - rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2016, 12: 171 - 183
- 19 Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population - based studies with 4.4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387(10027): 1513 - 1530
- 20 Eda H, Fukui H, Uchiyama R, *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* infection on the link between GLP - 1 expression and motility of the gastrointestinal tract [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177232
- 21 Ikari A, Tachihara Y, Kawano K, *et al.* Differential regulation of Na⁺, K⁺ - ATPase and the Na⁺ - coupled glucose transporter in hypertensive rat kidney [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1510(1 - 2): 118 - 124
- 22 Lehmann A, Hornby PJ. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(11): G887 - G898
- 23 阳恒, 高凌, 叶迎春, 等. 高盐摄入对小鼠血糖的影响以及肠道 SGLT - 1 表达的研究 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(11): 1266 - 1269, 1297

(收稿日期: 2021 - 01 - 14)

(修回日期: 2021 - 02 - 20)

(上接第 112 页)

- 14 陈厚宏, 陈建英, 林庭乐, 等. 经阴道三维彩色能量多普勒成像对瘢痕妊娠的诊断价值 [J]. *广州医药*, 2016, 47(5): 81 - 83
- 15 王琦, 陈莹莹. 阴道三维能量多普勒超声检测妊娠黄体血流对异位妊娠的诊断价值 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(16): 4689 - 4691
- 16 张华. VOCAL 技术对剖宫产后瘢痕憩室妊娠的诊断价值 [J]. *河南医学研究*, 2019, 28(19): 3590 - 3592
- 17 Litwicka K, Greco E. Caesarean seal pregnancy: a review of management options [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2011, 23(6): 414 - 421
- 18 刘婧, 赵建华, 红华. 三维能量多普勒超声对瘢痕妊娠治疗术后

子宫内腔容受性的评价 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2020, 42(2): 170 - 172

- 19 Takeda A, Koyama K, Imoto S, *et al.* Diagnostic multimodal imaging and therapeutic transcatheter arterial chemoembolization for conservative management of hemorrhagic cesarean scar pregnancy [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 152(2): 152 - 156
- 20 Zhou J, Yao M, Wang H, *et al.* Vaginal repair of cesarean section scar diverticula that resulted in improved postoperative menstruation [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2016, 23(6): 969 - 978

(收稿日期: 2021 - 01 - 30)

(修回日期: 2021 - 02 - 30)